

フェノール廃水処理 UASB グラニュール汚泥微生物群集の空間構造解析

東北大学大学院	学生会員	○五十嵐 慧
東北大学大学院	正会員	久保田 健吾
鹿児島工業高等専門学校	正会員	山田 真義
東北大学大学院	正会員	原田 秀樹

1. はじめに

フェノールは、さまざまな化学工業において重要な原料として用いられている一方、それらの過程で排出される廃水に含まれており、中毒性かつ発ガン性、突然変異原性、催奇形性を有する有毒物質である事が知られている。そこで近年、フェノール廃水の処理に嫌氣的生物処理を適用することが注目されており、処理プロセスの解明が進められている。

フェノールの分解に貢献している微生物を把握するには、微生物群集構造を解明する必要がある。また、嫌氣的条件下においては、1種類の微生物だけでは分解できない物質を2種類以上が親密に協力して分解を行う共生関係が重要である。例えば、メタン生成活性条件下におけるフェノールの生物分解は、芳香族分解細菌と水素資化性メタン生成古細菌の共生により進む。また嫌気環境下でフェノールを分解することが知られている微生物は、現在 *Syntrophorhabdus aromaticivorans*¹⁾ と *Cryptanaerobacter phenolicus*²⁾ の2種類しか知られていない。

そこで我々は、フェノールの生物学的処理メカニズムを明らかにすることを目的とし、フェノール廃水の処理を行っている UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) リアクター内に保持されたグラニュール汚泥の微生物群集構造を 16S rRNA 遺伝子クローン解析および、FISH (Fluorescence in situ hybridization) 法を用いて解析した。

2. 実験方法

2-1. リアクター・クローン解析

本研究では、フェノール濃度が 1,500-3,000 mgCOD/L となるように調整されたフェノール単一人工廃水の連続処理実験を行っている UASB (11L) リアクターを用いた。HRT は 9.2 時間、水温は 35°C 付近に調整した。連続処理実験の結果、本 UASB リアクターでは約 83% の COD 除去率が得られ、良好な処理を行っている。

UASB リアクターからのサンプリングはリアクター下部のサンプリングポートから行った。このサンプルに対して、16S rRNA 遺伝子を標的としたクローン解析を行った (プライマーセット: EUB8f or ARC109f / UNIV1500r)。解読して得られた塩基配列 (約 600 塩基) のデータを用いて Operational Taxonomic Unit (OTU) に分類し、ARB プログラムおよび NCBI の BLAST 相同

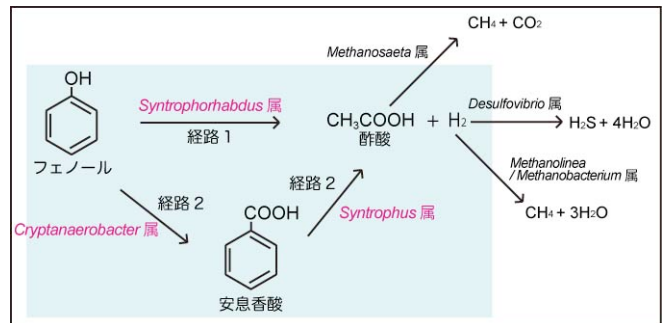


図1. 16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析結果から想定される UASB グラニュール汚泥内でのフェノール分解経路

性検索ツールを用いて系統解析を行った。各 OTU の代表クローンについては 16S rRNA 遺伝子の全長の配列を決定した。

2-2. FISH 法

FISH 法による微生物叢の解析には、UASB リアクターより採取したグラニュール汚泥を 4% パラホルムアルデヒドで固定処理したものを用いた。プローブの設計には、ARB プログラムの Probe Design を利用した。FISH 法のコントロールには当該配列を持つ菌株が必要となるが、分離菌株の入手および培養には時間がかかる。そのため、設計したプローブの評価を迅速に行うために Clone-FISH 法を用いてプローブの特異性を検証し、交雑条件の検討を行った。FISH 法は既報³⁾に準じて行った。

3. 実験結果・考察

3-1. クローン解析

16S rRNA 遺伝子に基づくクローン解析の結果、フェノール分解に貢献する *S. aromaticivorans* (28/117 クローン) および *C. phenolicus* (10/117 クローン)、*Syntrophus buswellii* (20/117 クローン) の3種類や *Desulfovibrio* 属 (13/117 クローン)、メタン生成古細菌 (37/38 クローン) などの微生物に近縁なクローンの存在が確認された。これにより、本 UASB リアクターにおけるフェノールの分解は、*Syntrophorhabdus* 属によって酢酸にまで直接分解されるもの (経路1) と、*Cryptanaerobacter* 属によって安息香酸に変換され、それを *Syntrophus* 属⁴⁾ などが酢酸にまで分解するもの (経路2) の2パターンが想定された (図1)。

3-2. FISH法によるグラニユーल汚泥の解析

クローン解析結果からだけでは2つの分解パターンのフェノール分解への貢献度は推測できない。そこで、FISH法による*Syntrophorhabdus*属と*Cryptanaerobacter*属、*Syntrophus*属の各々特異的な検出を行うことで、フェノール分解能を有する微生物の存在量や位置情報を明確なものにすることが必要であると考えた。しかし、これらのグループに特異的なプローブは報告されてない。そのため、各々のグループ内における16S rRNAの共通配列部分を探索し、各グループを各々カバーするプローブを設計した。しかしながら、*Syntrophorhabdus*属に特異的なプローブの設計は困難であったため、*Syntrophorhabdaceae*科に特異的なものを設計した。また、標的によって、設計したプローブと1塩基ミスマッチを有するクローンがクローン解析より得られたため、それらに対してはコンペティタープローブを用いることで対応した。このように設計したプローブが標的に交雑するための自由エネルギー変化量 ($\Delta G^{\circ}_{\text{overall}}$) を検討した結果、値の低いものに関しては数塩基をLNA (Locked nucleic acid) で置換することで問題を解消した。そして、より強い蛍光を得るために、蛍光物質を二重修飾したプローブ (DOPE) を用いることで蛍光強度の増加を試みた。

次に、設計したプローブを用い、当該 RNA を発現させた菌株と当該 RNA と逆配列を持つ RNA を発現させた菌株の識別を試みた。この結果より最適ホルムアミド濃度を決定した。

固定したグラニユーल汚泥に超音波分散を施したのに対して、DAPI と FISH 法による二重染色を行った。FISH 法に用いたプローブは、設計した上記3プローブの他、*Bacteria* を標的とした EUB338 プローブと *Archaea* を標的とした ARC915 プローブである。DAPI 染色細胞に対する存在率は、*Bacteria*: $36.8 \pm 1.7\%$ 、*Archaea*: $34.7 \pm 2.2\%$ 、*Syntrophorhabdaceae* 科: $22.2 \pm 0.6\%$ 、*Cryptanaerobacter* 属: $3.5 \pm 1.5\%$ 、*Syntrophus* 属: $14.4 \pm 0.6\%$ であった。この結果は、クローン解析結果と同様にフェノールの分解において、*Syntrophorhabdus* 属による経路1と *Cryptanaerobacter* 属と *Syntrophus* 属による経路2が共存している事を示唆している。

次に、これらの仮説を検証するため、グラニユーल汚泥の切片 FISH 法を行い、この微生物群集の空間分布の把握を試みた。まず、EUB338 プローブと ARC915 プローブを用いて二重染色を行った結果、グラニユール表層部には *Bacteria* が、中心部には *Archaea* が存在している事が確認され、その2種類が混在している部分も確認できた(図2-A)。さらに、*Syntrophorhabdaceae* 科に特異的なプローブと、*Cryptanaerobacter* 属に特異的なプローブ、*Syntrophus* 属に特異的なプローブを用いて多重染色を行った。その結果、グラニユール汚泥の内側に *Syntrophorhabdaceae* 科が、外側には *Cryptanaerobacter* 属と *Syntrophus* 属が存在していることが確認でき、

Cryptanaerobacter 属と *Syntrophus* 属は非常に親密な関係をとっていることが明らかとなった(図2-B)。このことから、フェノール分解に直接寄与する *Syntrophorhabdaceae* 科と *Cryptanaerobacter* 属の2つのグループがグラニユール内部で住み分けをしていることが明らかとなり、その原因として基質親和性等の違いによる影響の可能性が示唆された。また、グラニユール中心部においてもフェノールの分解が進行している事が明らかとなった。

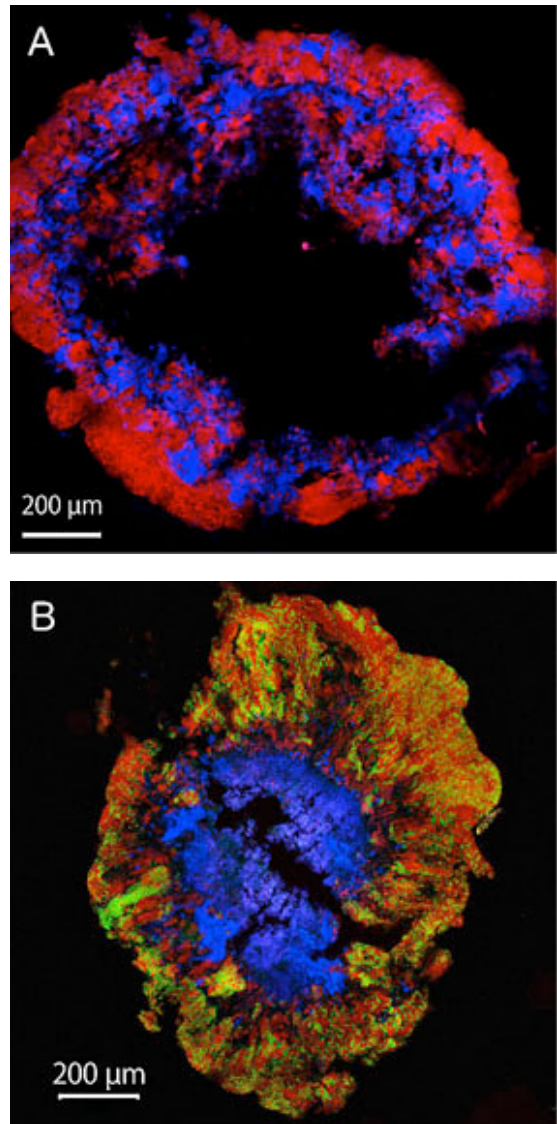


図2. 多重染色FISH法によるグラニユール汚泥微生物群集の空間構造. A: EUB338 (赤) と ARC915 (青), B: *Syntrophorhabdaceae* 科 (青), *Cryptanaerobacter* 属 (緑), *Syntrophus* 属 (赤).

参考文献

- 1) Qiu *et al.* (2008) *AEM*, **74**, 2051-2058.
- 2) Juteau *et al.* (2005) *IJSEM*, **55**, 245-250.
- 3) Kubota *et al.* (2006) *AEM*, **72**, 5311-5317.
- 4) Mountfort *et al.* (1984) *IJSB*, **34**, 216-217.